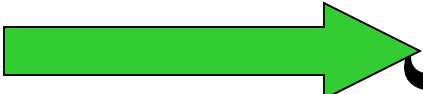


آنزیم

محصول  سوستر



- آنزیم سبب کاهش انرژی فعالسازی واکنش میشود
- آنزیم مقدار ثابت تعادل را تغییر نمیدهد

واحد بین المللی فعالیت آنزیم

– مقداری از آنزیم که در مدت **یک دقیقه** در شرایط مطلوب دما و pH بتواند **یک میکرومول سوبسترا** را به محصول تبدیل نماید

– فعالیت را می توان بر حسب واحد ها ، میلی واحدها یا میکروواحدها در واحد حجم نمونه بیان کرد (U/L)

واحد کاتال

مقداری از آنزیم که در مدت یک ثانیه
در شرایط مطلوب دما و pH بتواند
یک مول سوبسترا را به محصول
تبدیل نماید

اساس اندازه گیری آنزیم

-بعلت مقادیر کم آنزیم در سرم ، بافت وسایر مایعات بدن از فعالیت وقدرت کاتالیتیکی آن در واحد حجم استفاده می شود

- فعالیت آنزیم ها در حالت اپتیما از نظر PH ، حرارت ، غلظت ماده اولیه ، غلظت کوفاکتورها وغیره اندازه گیری می شود

-فعالیت آنزیم ها در بیماری های گوناگون تغییر می کند وتعیین آن در تشخیص وپیشگیری ارزش فراوان دارد

روش های اندازه گیری فعالیت آنزیم

۱- کم شدن غلظت ماده اولیه : اساس کاهش مقدار سوبسترا در مدت زمان معین

۲- اندازه گیری ماده تولید شده (محصول) : ماده تولید شده را می توان با روش های فتومتری ، حجم سنجی (اثر کربنیک انیدراز روی اسید کربنیک) ، تیتراسیون (اثر استیل کولین استراز روی استیل کولین)

۳- تغییرات کوآنزیم در جریان واکنش : تغییرات از حالت اکسید به احیا و برعکس (کوآنزیم های نیکوتینی) . فرم احیای آنها در ناحیه UV جذب بیشتری دارند.

روش های اندازه گیری آنزیم

- Two Point
- Multiple Point
- Kinetic Assay
- The Rate of Reaction
- End Point (Enzymatic/ colorimetric)

The Two Point

- مقدار محصول تولید شده یا سوبسترای مصرفی در زمان معینی تعیین می گردد
- سرم یا پلاسما به محلول ماده اولیه که دارای غلظت معین می باشد افزوده شده (A_1) وبعد از زمان معین غلظت سوبسترا با استفاده از تغییرات جذب نوری (A_2)
محاسبه $A = A_1 - \Delta A_2$

The Multiple Point(Karmen)

- بجای یک $A\Delta$ چندین $A\Delta$ از واکنش در حال پیشرفت بدست آمده و سرانجام $A/t\Delta$ را محاسبه می نماییم

- دقت سنجش بیشتر است

The Kinetic Assay

- در این روش نیاز به یک واکنش تنظیم شده و ادامه دار در شرایط اپتیموم داشته تا بتوان کمترین مقدار محصولی که بدست می آید یا مقدار سوبسترای که مصرف می گردد را (بطور مداوم) اندازه گیری کرد
- امتیازات این روش : دقت ، حساسیت و درستی بالا
- معایب : وقت زیاد

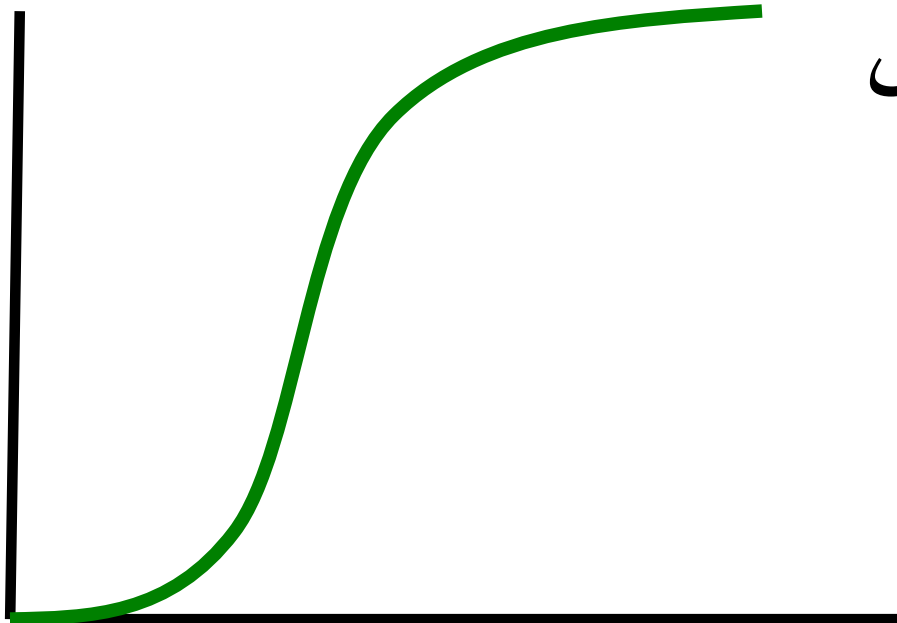
The Rate of Reaction

- در این روش سرعت واکنش آنزیمی (سرعت تبدیل سوبسترا به محصول) اندازه گیری می گردد نه مقدار
- سرعت بستگی مستقیم به فعالیت آنزیم دارد
- در این روش باید واکنش از فاز اولیه (lag phase) گذشته تا به سرعت یکنواخت برسد و ثانيا واکنش باید خطی باشد

سرعت

واکنش

سوستر



End Point (Enzymatic/ colorimetric)

- در این روش یک واکنش آنزیمی را با یک واکنش رنگ زا همراه کرده و میزان فعالیت آنزیم به شدت رنگ ایجاد شده بستگی دارد
- در اینجا اندازه گیری در پایان واکنش انجام می گیرد

نکات مهم در اندازه گیری آنزیم

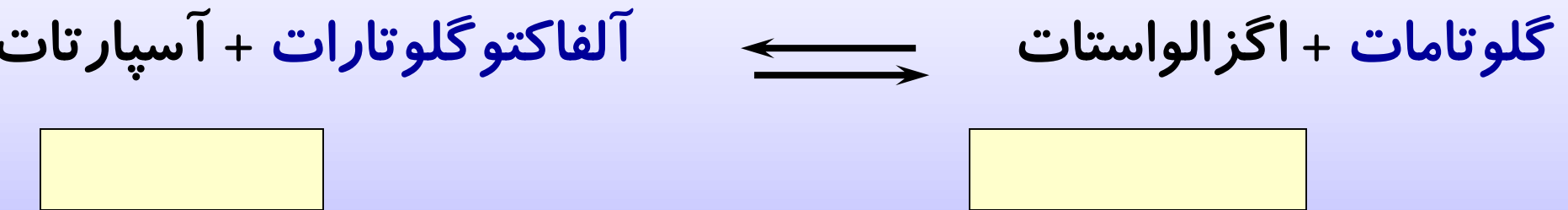
۱- نمونه لازم : ارجحیت سرم نسبت به پلاسما (محدودیت
ضد انعقاد)

۲- عدم استفاده از سرم همولیز

۳- از ظروف استریل ولو له های آزمایش یکبار مصرف (عوامل مهار کننده و PH)

۴- نمونه گیری در صبح و ناشتا بودن

آسپارتات ترانس آمیناز یا گلوتامات اگزالواستات ترانس آمیناز



برای انجام واکنش به PLP احتیاج است
این آنزیم در **سیتوپلاسم و میتوکندری** بافت قلب، کبد، عضلات، کلیه
گلبول قرمز و وجود دارد

علل افزایش کاذب

- همولیز نمونه
- طولانی شدن فاصله زمانی تهیه سرم از نمونه

علت افزایش فیزیولوژیک

- در نوزادان چندین برابر افراد بالغ است

علل افزایش شدید

• آسیب پارانشیم کبد از جمله :

—هپاتیت ویروسی

—نکروز کبدی حاصل از سموم

—نارسایی در گردش خون همراه با شوک و
هیپوکسی

—عفونت منونوکلئوز

علل افزایش خفیف

- سکتة قلبی : ۸ - ۶ ساعت بعد از سکتة شروع به افزایش نموده، پیک آن ۲۴ - ۱۸ ساعت بعد از سکتة مشاهده شده و حدود چهار الی پنج روز بعد به حد طبیعی میرسد
- سیروز
- یرقان انسدادی
- سرطان کبد
- دیستروفی عضلانی و درمامیوزیت
- جراحی و آسیب بافت عضلانی
- کم خونی همولیتیک

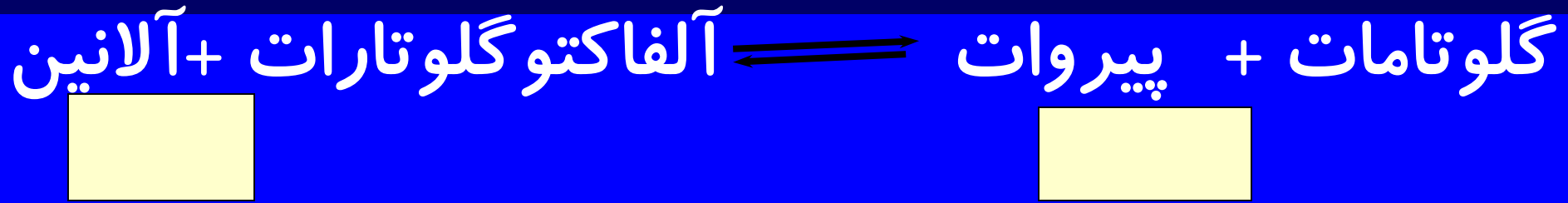
سنگش به روش شیمیایی

- در روش ریتمن - فرانکل، اگزالواستات حاصل با ۲ و ۴ دی نیترو فنیل هیدرازین در محلول قلیایی تولید رنگ مینماید که متناسب با فعالیت آنزیم است.
- نمونه مورد استفاده سرم عاری از همولیز است.
- سرم باید در اسرع وقت تهیه شود.
- در دمای 4°C آنزیم به مدت یک الی سه روز است.

سنجش به روش آنزیمی

- اگزالواستات حاصل با NADH توسط آنزیم مالات دهیدروژناز واکنش میدهد. میزان کاهش جذب در طول موج ۳۴۰ نانومتر متناسب با مقدار آنزیم است.
- NADH در طول موج ۳۴۰ نانومتر دارای جذب میباشد.

آلانی ترانس آمیناز یا گلوتامات پیروات ترانس آمیناز



- برای انجام واکنش به PLP احتیاج است
- این آنزیم در سیتوپلاسم بافت کبد، عضله اسکلتی، کلیه، قلب و وجود دارد

علل افزایش شدید

- هیپاتیت ویروسی
- نکروز کبدی در اثر سموم
- نارسایی در گردش خون همراه با شوک و هیپوکسی
- عفونت منونوکلئوز

علل افزایش خفیف

- سیروز
- یرقان انسدادی
- احتقان کبدی
- جراحی و آسیب بافت عضلانی
- سکتہ قلبی

The End

لاکتات دهیدروژناز

LDH یا LD

آنزیم لاکتات دهیدروژناز واکنش زیر را کاتالیز مینماید :

$$\text{NAD}^+ + \text{لاکتات} \rightleftharpoons \text{پیروات} + \text{H} + \text{NADH}$$

این آنزیم تقریباً در سیتوپلاسم تمام سلولهای بدن وجود دارد و فعالیت آن در بافتها حدود ۵۰۰ برابر فعالیت آن در سرم است. اصولاً سنجش آنزیم لاکتات دهیدروژناز تام به عنوان یک شاخص غیر اختصاصی صدمه سلولی به حساب میآید.

این آنزیم به صورت تترامر بوده و از دو نوع زنجیر پپتیدی H و M ساخته شده است. آنزیم لاکتات دهیدروژناز دارای پنج ایزوآنزیم بوده که میتوان توسط الکتروفورز آنها را تفکیک نمود. اخیرا ایزوآنزیم نوع ششم نیز مشاهده شده است.

ایزوآنزیم	ساختار	بافت دارای ایزوآنزیم	خصوصیت ایزوآنزیم
LD-1	HHHH	قلب، کلیه، گلبول قرمز، لوزالمعده، مگالوبلاست	این ایزوآنزیم دارای فعالیت هیدروکسی بوتیرات دهیدروژنازی میباشد.
LD-2	HHHM	قلب، گلبول قرمز، غدد لنفاوی، تیروئید، طحال، ریه	
LD-3	HHMM	غدد لنفاوی، طحال، تیروئید، پلاکت	به هنگام انعقاد خون افزایش مییابد
LD-4	HMMM	عضله، ریه، کبد	
LD-5	MMMM	کبد، عضله، گرانولوسیت، لنفوسیت	
LD-X	-	بیضه، اسپرم	

الگوی الکتروفورز ایزوآنزیمهای آنزیم لاکتات دهیدروژناز

آند : LD-1 , LD-2 , LD-3 , LD-4 , LD-5 : کاتد

میل ترکیبی زیر واحد H برای
لاکتات بیشتر از پیرووات
است. ایزوآنزیمهای دارای
زیر واحد H در ایجاد پیرووات
نقش دارند. LD-1 توسط
پیرووات مهار میگردد.

علل افزایش کاذب

۱ - همولیز نمونه

۲ - فاصله طولانی بین زمان نمونه گیری و تهیه سرم

علل افزایش شدید

۱ - سکته قلبی : آنزیم لاکتات دهیدروژناز حدود ۱۲ ساعت بعد از شروع سکته قلبی افزایش یافته، بعد از ۹۶ - ۷۲ ساعت به حداکثر رسیده و بعد از ۱۰ روز به حد طبیعی میرسد.

۲ - برخی از اختلالات خونی از جمله آنمی مگالوبلاستیک

۳ - نارسایی در گردش خون همراه با شوک و هیپوکسی

۴ - وقفه کلیوی و در برخی از موارد رد پیوند کلیه

علل افزایش خفیف

- ۱ - هیپاتیت ویروسی
- ۲ - سرطان
- ۳ - بیماریهای عضلانی
- ۴ - آمبولی ریه
- ۵ - عفونت منونوکلئوز

در حالت طبیعی $LD-2 > LD-1$ است
اما در سگته قلبی $LD-1 > LD-2$
میشود که به این حالت flipped LD
میگویند.



کراتین کیناز

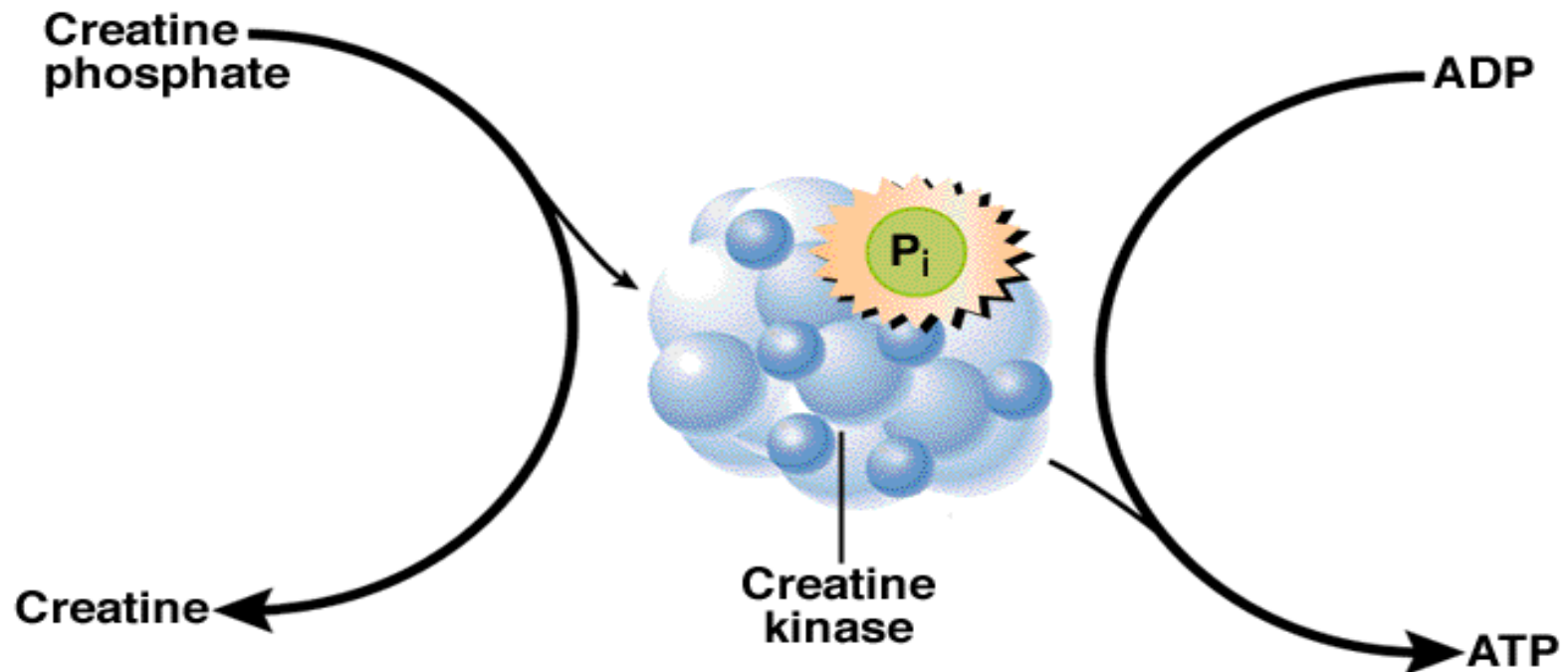
CK یا CPK

آنزیم کراتین کیناز یا کراتین فسفو کیناز
واکنش زیر را کاتالیز مینماید :



این آنزیم در عضلات مخطط، قلب، مغز، کلیه و
ریه وجود دارد.

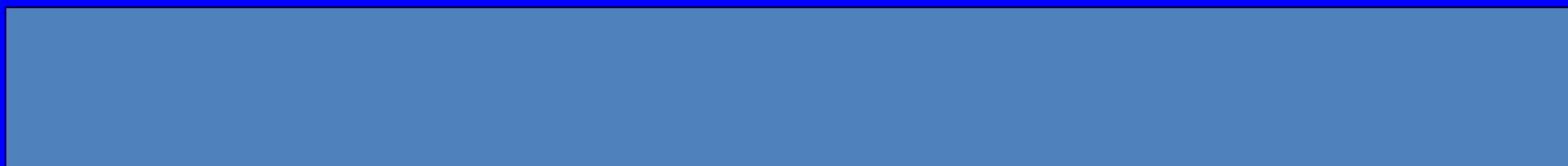
Creatine Kinase (CK)



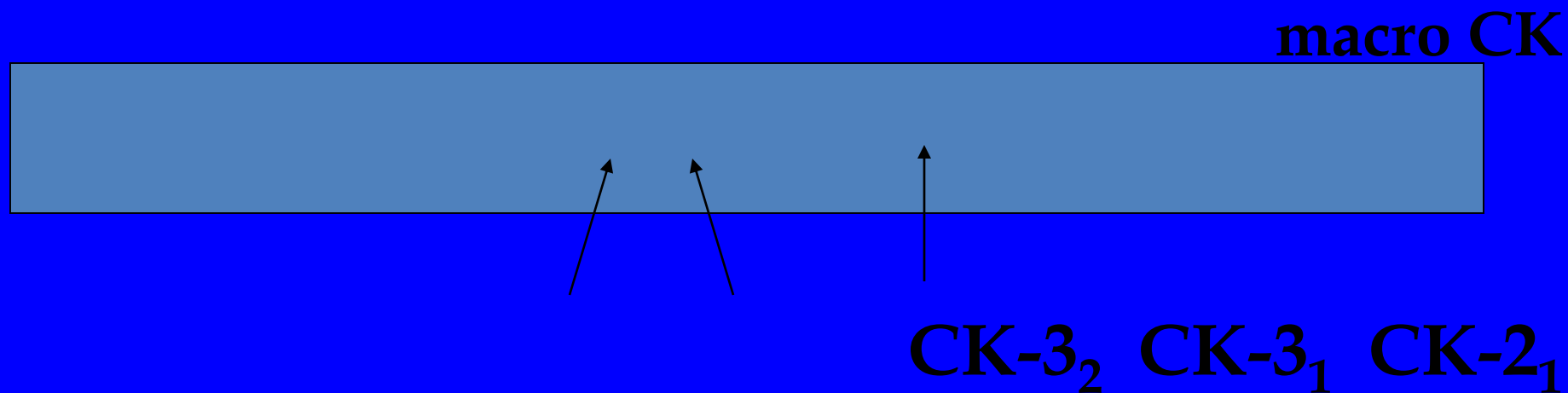
آنزیم کراتین کیناز به
صورت دیمری است
که از دو نوع زیر واحد
B و M ساخته شده
است.

ایزوآنزیم	ساختار	بافت حاوی ایزوآنزیم	خصوصیت
CK-1	BB	مغز، تیروئید، عضلات صاف، سیستم گوارشی و تناسلی	در سرم مشاهده نمیشود
CK-2	MB	قلب، به مقدار کم در عضلات	5% آنزیم کراتین کیناز خون را تشکیل میدهد
CK-3	MM	عضلات، قلب، استخوان	95% آنزیم کراتین کیناز خون را تشکیل میدهد

الگوی الکتروفورز ایزوآنزیمهای کراتین کیناز به
صورت زیر است :



الگوی الکتروفورز ایزوآنزیمهای کراتین کیناز به
صورت زیر است :



برای جداسازی ایزوآنزیمهای
کراتین کیناز علاوه بر روش
الکتروفورز روی استات سلولز یا
محیط آگاروز میتوان از روشهای
کروماتوگرافی تعویض یونی،
مهار شونده‌گی توسط آن‌تی بادی،
فعال شونده‌گی انتخابی و سنجش
ایمونولوژیکی استفاده نمود.

علل افزایش فیزیولوژیک

۱ - در نوزادان

۲ - چند روز بعد از زایمان

علل افزایش شدید

۱ - سکته قلبی : آنزیم کراتین کیناز اولین آنزیمی است که بعد از سکته قلبی در خون افزایش مییابد.

۲ - دیستروفی عضلانی و تحلیل عضلات اسکلتی

۳ - شوک و نارسایی گردش خون

علل افزایش خفیف

- ۱ - آسیب عضلانی
- ۲ - بعد از جراحی
- ۳ - تمرینات ورزشی
- ۴ - تزیقات مکرر عضلانی
- ۵ - هیپوتیروئیدیسم
- ۶ - مصرف برخی از داروها
- ۷ - در بعضی از تومورها
- ۸ - بیماریهای درگیرکننده سلسله اعصاب مرکزی

سنجش آنزیم کراتین
کیناز در تشخیص
مرگ جنین در داخل
رحم مهم میباشد

مقدار طبیعی آنزیم کراتین کیناز به
سن، جنس، نژاد، وزن، توده
عضلانی و فعالیت فیزیکی بستگی
دارد. میزان فعالیت در مردان
بیشتر از زنان است. در سیاه
پوستان فعالیت آنزیم از سفید
پوستان بیشتر است



الكالين فسفاتاز

ALP

این آنزیمها فسفاتازهایی هستند
که در محیط قلیایی فعال میباشند
این آنزیمها سبب هیدرولیز
فسفومنواسترها میگردند. این
آنزیمها همچنین توانایی انتقال
گروه فسفات را نیز دارند.

الكالين فسفاتاز آنزيم غشايي بوده
كه تاكنون سوبستراى طبيعى آن
مشخص نشده است. در افرادى كه
فاقد الكالين فسفاتاز هستند ميزان
فسفواتانل آمين افزايش مييابد و
تصور ميشود كه اين جسم يكي از
سوبستراهاى الكالين فسفاتاز
باشد.

اعمال الکالین فسفاتاز

- ۱ - انتقال قند و فسفات از سلولهای موکوزال روده، توبولهای کلیه، جفت و استخوان
- ۲ - انتقال لیپید در روده
- ۳ - شرکت در هیدرولیز پیروفسفات داخل سلولی
- ۴ - نقش در فرایند کلسیفیکاسیون استخوانی

الکالین فسفاتاز تقریبا در تمام بافتهای بدن وجود دارد از جمله اپیتلیوم روده، توبولهای کلیه، استخوان، کبد، جفت و طحال. در سرم افراد طبیعی ایزوآنزیمهای کبدی، استخوانی و روده ای مشاهده میشود.

در برخی از بیماریهای
بدخیم ایزوآنتریمی از
الکالین فسفاتاز به نام
ریگان دیده میشود که
خصوصیات آن مشابه
ایزوآنتریم جفتی است.

آنزیم الکالین فسفاتاز در ادرار
نیز مشاهده میشود که از
منشاء کلیوی بوده و در اثر
کلیرانس آنزیم موجود در
خون نمیباشد. مقدار درصد
ایزوآنزیمهای الکالین فسفاتاز
در سرم وابسته به سن است.

الگوی الکتروفورز ایزوآنزیمهای الکالین فسفاتاز

آند : پیش کبدی کبدی استخوانی جفتی روده ای : کاتد

ایزوآنزیم کبدی و استخوانی همپوشانی دارند. ایزوآنزیم جفتی نیز در محدوده ایزوآنزیم استخوانی ظاهر میگردد. خصوصیات **ایزوآنزیم ریگان** مشابه ایزوآنزیم جفتی بوده و در همان ناحیه ایزوآنزیم جفتی در الگوی الکتروفورز مشاهده میشود.

با استفاده از لکتین
wheat-germ و یا
افزودن آنزیم نورامینیداز
به مدت کوتاه بهتر میتوان
ایزو آنزیم کبدی و
استخوانی را تفکیک نمود.

کمپلکس الکالین فسفاتاز با
آنتی بادی ناحیه پیش کبدی
یا fast liver را به وجود میآورد.
این کمپلکس در متاستازهای
کبدی و بیماریهای کبدی همچون
هیپاتیت ویروسی و سیروز الکلی
مشاهده میشود.

با استفاده از روشهای
الکتروفورز، غیر فعال شدن
توسط حرارت، مجاورت با مواد
مهارکننده یا دناتوره کننده
شیمیایی، کروماتوگرافی تعویض
یونی و روشهای ایمونولوژیک
میتوان ایزوآنزیمهای الکالین
فسفاتاز را تفکیک نمود.

با توجه به این که برخی از
تفاوت‌های بین ایزوآنزیم‌های
الکالین فسفاتاز بسیار جزئی است
با استفاده از یک روش بسختی
میتوان ایزوآنزیم‌ها را کاملاً تفکیک
نمود.

در حرارت 65°C به مدت ۱۵ دقیقه
ایزوآنزیمهای کبدی، استخوانی و
روده ای ناپایدار بوده در حالی که
ایزوآنزیم جفتی و ریگان پایدار میباشند.
در حرارت 56°C به مدت ۱۰ دقیقه
ایزوآنزیم کبدی پایدار بوده در صورتی
که ایزوآنزیم استخوانی ناپایدار است.

در بیمار غیر حامله اگر فعالیت
الکالین فسفاتاز در نمونه ای که
۱۰ دقیقه در دمای 56°C حرارت
داده شده است بیش از ۳۵٪ نمونه
حرارت داده نشده باشد ایزوآنزیم
کبدی بالاست و اگر کمتر از ۲۵٪
باشد ایزوآنزیم استخوانی بالاست.

در حضور محلول اوره سه مولار به مدت ۱۸ دقیقه در دمای 37°C ایزوآنزیم جفتی و روده ای نسبت به سایر ایزوآنزیمها فعالیت خود را کمتر از دست میدهند. محلول L - فنیل آلانین ۵ میلی مولار روی کاهش فعالیت ایزوآنزیمهای کبدی و استخوانی اثر کمتری دارد.

سنجش فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز در
دو وضعیت زیر حائز اهمیت میباشد :

۱ - بیماری کبدی - صفراوی
(hepatobiliary)

۲ - بیماری استخوانی همراه با افزایش
فعالیت استئوبلاستی

علل افزایش فیزیولوژیک

- ۱ - کودکان تا سن بلوغ به دلیل رشد استخوانها
- ۲ - دوران بلوغ
- ۳ - سه ماه آخر حاملگی (تا یک ماه بعد از زایمان نیز ALP بالاست)
- ۴ - کهولت
- ۵ - بعد از مصرف غذای چرب به خصوص در افراد دارای گروه خونی O و B

علل افزایش پاتولوژیک

الف - آسیبهای استخوانی (استئوبلاستیک)

۱ - بیماری پاژه

۲ - هایپرپاراتیروئیدیسم اولیه و ثانویه

۳ - متاستازهای استخوانی

۴ - راشیتیزم

۵ - استئومالاسی

۶ - شکستگی استخوان

ب - آسیبهای کبدی

۱ - آسیبهای ناشی از کلستاز (کند

شدن جریان صفرا)

۲ - سیروز

۳ - هیپاتیت حاد

۴ - عفونت منونوکلئوز

کبد به هنگام انسداد مجاری صفراوی
الکالین فسفاتاز بیشتری را بیوسنتز
مینماید. مقداری از آنزیم ساخته شده
توسط هیاتوسیتهای کنار مجاری
صفراوی وارد خون شده و سبب افزایش
میزان آنزیم الکالین فسفاتاز در خون
میشوند.

در انسداد خارج کبدی (به دلیل
سنگ صفرا یا سرطان سر
لوزالمعده) نسبت به انسداد داخل
کبدی (کلستاز ناشی از دارو یا
تهاجم بافت سرطانی) افزایش
شدیدتر آنزیم الکالین فسفاتاز
مشاهده میشود.

هرچه انسداد کاملتر شود افزایش
فعالیت آنزیم الکالین فسفاتاز بیشتر
میگردد. در بیماریهای کبدی که
سلولهای پارانشیمال کبدی آسیب می
بینند (هپاتیت عفونی) افزایش کمی
در میزان آنزیم الکالین فسفاتاز دیده
میشود.

علل افزایش پاتولوژیک

پ - در برخی از سرطانها به
دلیل تولید اکتوپیک
ت - زخم معده، اثنی عشر و
کولون

علل کاهش فعالیت الکالین فسفاتاز

- ۱ - هیپوتیروئیدیسم
- ۲ - اسکوروی
- ۳ - بیماری سیلیاک
- ۴ - سندروم شیر قلیایی
- ۵ - تجویز زیاد ویتامین D
- ۶ - هیپوفسفataزی
- ۷ - آنمی پرئیشیوز



أميلزو

آلفا - آمیلاز در حیوانات و **بتا - آمیلاز** در گیاهان و باکتریها وجود دارد. نشاسته و گلیکوژن سوپسترای این آنزیم میباشند. وزن مولکولی آلفا- آمیلاز (دیاستاز) ۴۵۰۰۰ بوده و در بزاق، لوزالمعده، کبد، عضلات و لوله های زهدان وجود دارد.

آمیلاز در حالت طبیعی در
ادرار یافت می شود. آمیلاز
موجود در پلاسما به طور
طبیعی از غدد بزاقی و
لوزالمعده سرچشمه
میگیرد.

علل افزایش شدید غلظت

۱ - پانکراتیت حاد (۲۴ ساعت بعد از درد افزایش یافته و بعد از ۲-۷ روز به حد طبیعی بر می گردد)

۲ - نقص شدید گلو مری

۳ - کتواسیدوز دیابتی حاد

علل افزایش خفیف غلظت

۱ - اختلالات حاد شکمی

- زخم معده سوراخ شده
- التهاب شدید کیسه صفرا
- انسداد حاد روده
- ضربه شکمی
- قطع حاملگی خارج رحمی

۲- اختلالات غدد بزاقی مثل اوریون

۳- تجویز مورفین

۴- نقص شدید گلومرولی

۵- کتوزیس دیابتی

۶- گاهی در سکته قلبی


۷- به طور موقت در مسمومیت الکلی
شدید

۸- ماکروآمیلازی

به جز در نارسایی کلیوی و
ماکروآمیلازی به هنگام
افزایش غلظت پلاسمای،
دفع ادراری نیز افزایش
مییابد.

لیپاز

آنزیم لیپاز (گلیسرول استر هیرولاز) واکنش زیر را کاتالیز
مینماید :

منوآسیل گلیسرول + دو مولکول اسید چرب  دو مولکول آب + تری گلیسرید

pH مناسب این واکنش ۹ - ۷ میباشد.

این آنزیم در ترشحات لوزالمعده،
روده و معده و نیز در گلبولهای
قرمز و سفید، ادرار و مایع نخاع
مشاهده شده است. آهن موجود
در هموگلوبین فعالیت آنزیم را
مهار میکند.

علل افزایش فعالیت

- ۱ - انسداد مجاری لوزالمعده (افزایش لیپاز در این حالت از افزایش آمیلاز اختصاصی تر است)
- ۲ - پارگی یا انسداد روده
- ۳ - سرطان پانکراس